

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2013

Autores

Cynthia Maria Borges Damasceno

Bióloga, Ph.D., Pesq.
Embrapa Milho e Sorgo,
Caixa Postal -151, CEP
35701-970 Sete Lagoas,
MG, cynthia.damasceno@embrapa.br

Rafael Augusto da Costa Parrella

Engº- Agrº, D.Sc., Pesq.
Embrapa Milho e Sorgo,
Caixa Postal -151, CEP
35701-970 Sete Lagoas,
MG, rafael.parrella@embrapa.br

Vander Fillipe de Souza

Engº- Agrº, M.Sc.,
Doutorando do Programa
de Pós-graduação em
Bioengenharia UFSJ,
São João del-Rei, MG,
vanderfsouza@gmail.com

Maria Lúcia Ferreira Simeone

Química, D.Sc., Pesq.
Embrapa Milho e Sorgo,
Caixa Postal -151, CEP
35701-970 Sete Lagoas,
MG, marialucia.simeone@embrapa.br

Robert Eugene Schaffert

Engº- Agrº, Ph.D., Pesq.
Embrapa Milho e Sorgo,
Caixa Postal -151, CEP
35701-970 Sete Lagoas,
MG, robert.schaffert@embrapa.br

Embrapa

Análise Morfoagronômica e Bioquímica de Um Paineiro de Sorgo Energia para Características Relacionadas à Qualidade da Biomassa

Introdução

Por causa da crise mundial de energia, em conjunto com a procura de combustíveis renováveis e menos poluentes, o interesse em culturas dedicadas à produção de biocombustíveis aumentou, especialmente para a obtenção de etanol de segunda geração, produzido a partir de biomassa (lignocelulose), e para a cogeração de energia, resultante da queima da biomassa para produção de eletricidade. Espera-se que, para suprir a demanda mundial, a produção futura de combustíveis renováveis e sustentáveis requeira uma produção de biomassa consistente, contínua, e dedicada aos biocombustíveis. Tem sido proposto que a biomassa lignocelulósica oriunda de várias fontes, incluindo resíduos de lavoura, como bagaço de cana e palha de milho, além de árvores e gramíneas, representa a melhor fonte alternativa para produção em larga escala de etanol celulósico, ou de segunda geração, por ser renovável, geograficamente distribuída e relativamente favorável no que diz respeito à emissão de gases poluentes (DEMIRBAS, 2005; SOMERVILLE, 2006, 2007).

Apesar disso, o processo para utilização de lignocelulose na produção de biocombustíveis ainda não está totalmente otimizado, sendo que as etapas de pré-tratamento e sacarificação ainda se encontram em fase de desenvolvimento para a fabricação em escala industrial (LOPEZ-CASADO et al., 2008). Um dos obstáculos técnicos se deve à alta concentração de lignina encontrada nos materiais vegetais. A lignina é um composto polifenólico da parede celular, que pode interferir diretamente com a hidrólise enzimática da celulose por deixar as microfibras fisicamente menos acessíveis a enzimas ou, indiretamente, por liberar subprodutos de sua própria degradação que podem inibir o processo fermentativo subsequente (DAMASCENO et al., 2010; VAN DER WEIJDE et al., 2013).

Além disso, culturas dedicadas à produção de bioenergia, incluindo o sorgo, não foram melhoradas especificamente para o seu total aproveitamento em produção de bioenergia, e por isso pouco se sabe sobre as características relevantes a este sistema ou a genética que controla tais fenótipos (VERMERRIS et al., 2007). Para o melhoramento de sorgo visando à produção de bioenergia, é importante identificar, caracterizar e quantificar a variabilidade genética disponível, bem como definir os fenótipos que sejam favoráveis à produção de etanol de segunda geração.

Além do sorgo sacarino, o programa de melhoramento de sorgo da Embrapa Milho e Sorgo possui acessos genéticos de sorgo de alta biomassa, que em média podem chegar a mais de 30 ton/ha de matéria seca, sendo que alguns materiais experimentais do programa de melhoramento já apresentam produtividade acima de 50 ton/ha de matéria seca (PARRELLA et al., 2010, 2011). Uma característica importante é que o sorgo já apresenta naturalmente menores teores de lignina que a cana-de-açúcar, além de possuir mutantes que podem apresentar até 50% menos lignina que a cultivar original (BARRIÈRE et al., 2007; SABALLOS et al., 2009; DAMASCENO et al., 2010), chamados de *bmr* (*brown midrib*), os quais apresentam nervura central marrom-avermelhada. Esses mutantes recessivos *bmr* já estão sendo utilizados no programa de melhoramento de sorgo para produção de cultivares com alta biomassa e menores teores de lignina (DAMASCENO et al., 2012). Essas características fazem do sorgo uma cultura com grande potencial para produção de etanol de segunda geração.

Dessa forma, em resposta a um cenário de crise energética mundial e para manter o Brasil em lugar competitivo no mercado de biocombustíveis, e em consonância com as proposições do Plano Nacional de Agroenergia e do Plano Diretor da Embrapa Milho e Sorgo, este trabalho teve como propósito auxiliar e aumentar a eficiência do programa de melhoramento de sorgo sacarino e lignocelulósico da Embrapa Milho e Sorgo, caracterizando bioquimicamente e identificando acessos que apresentem menores teores do composto lignina e alta produção de biomassa, visando à produção de etanol em larga escala. Os acessos identificados poderão ser utilizados diretamente no programa de melhoramento, no desenvolvimento de híbridos de sorgo energia de alta produção de biomassa, além de contribuir para estudos genéticos futuros que nos permitam o melhor entendimento das

características mais importantes relacionadas a alta produção de biomassa de qualidade.

Painel Amplo de Sorgo para Caracterização da Biomassa

A fim de se estudar a variabilidade fenotípica para características associadas à produção e composição da biomassa dos materiais disponíveis para melhoramento de sorgo visando produção de bioenergia, um painel amplo de sorgo biomassa contendo 100 linhagens foi utilizado nessa proposta.

Esse painel foi elaborado por melhoristas de sorgo e pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, e possui materiais de origens diversas, a exemplo de materiais do banco de germoplasma da Embrapa, coleções núcleo do CIRAD (França) e ICRISAT (Índia), além de materiais pertencentes aos programas de melhoramento de sorgo forrageiro da Embrapa. Esses materiais foram selecionados com base em dados disponíveis em publicações, e também com base em avaliações realizadas na Embrapa Milho e Sorgo para características agrônômicas importantes para a produção de biomassa, como altura de planta, peso de massa verde, peso de massa seca, tempo de florescimento e sensibilidade ao fotoperíodo. Cerca de 50% do painel corresponde a linhagens sacarinas, que apresentam alta produção de biomassa.

Caracterização Morfoagronômica e Bioquímica do Paineiro para Características Associadas à Produção e Composição da Biomassa

A fim de auxiliar no desenvolvimento de híbridos de sorgo biomassa com melhor qualidade de biomassa e, portanto, com grande potencial para produção de etanol de segunda geração, o painel diverso de sorgo descrito acima foi caracterizado agronomicamente e bioquimicamente após condução de dois ensaios em Sete Lagoas-MG, em períodos

de lavoura agrícola em anos consecutivos (2011 e 2012), utilizando-se o delineamento experimental de látice (10 x 10). As seguintes características morfoagronômicas foram avaliadas: i) florescimento: número de dias da semeadura até o início da liberação de pólen em 50% das plantas da parcela; ii) altura de plantas (AP): altura média, em metros, das plantas de cada parcela, medidas da superfície do solo ao ápice da panícula; e iii) produção de massa verde total (PMV) e massa seca total (PMS): determinada em kg/parcela, através da pesagem de todas as plantas (completas) de cada parcela, colhidas na maturidade fisiológica do grão.

Além da caracterização morfoagronômica, a composição da biomassa foi avaliada bioquimicamente, através da determinação das proporções de fibra em detergente ácido (FDA) e neutro (FDN), celulose, hemicelulose e lignina. Todas as avaliações foram conduzidas em laboratório da Embrapa Milho e Sorgo, utilizando-se métodos padrões de análise de composição centesimal. Para a obtenção da proporção de FDA, FDN e lignina adotaram-se as respectivas metodologias do manual ANKOM Fiber Analyzer: "Technology Method 5" (2006), "Technology Method 6" (2006) e "Method for determining acid lignin in beakers" (2010). As proporções de hemicelulose e celulose foram estimadas pela diferença entre os valores de FDN e FDA, e pelos valores de FDN e lignina, respectivamente.

Os resumos das análises de variância para florescimento, altura de plantas, produção PMV, produção de PMS, FDA, FDN, teor de celulose, teor de hemicelulose e teor de lignina estão apresentados na Tabela 1. Verificaram-se diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre os genótipos avaliados para todas as características. Os dados do primeiro ano de plantio indicaram: florescimento dos genótipos variou de 61 a 88 dias, altura de plantas variou de 1,00 a 4,70 m, produção de massa verde variou de 5,11 a 92,88 t.ha⁻¹, produção de

massa seca variou de 1,15 a 27,68 t.ha⁻¹, FDA variou de 25,76 a 52,59%, FDN variou de 46,14 a 77,76%, teor de celulose variou de 23,49 a 44,79%, teor de hemicelulose variou de 18,79 a 29,44% e teor de lignina variou de 1,69 a 9,22%, mostrando que os genótipos apresentaram variabilidade fenotípica entre si quanto as características avaliadas. Os dados do segundo ano de plantio foram similares. A Figura 1 mostra os valores médios para os dois anos do teor de lignina nos materiais avaliados. Verifica-se uma importante variabilidade fenotípica dentro do painel, importante para a condução do programa de melhoramento.

Nesta caracterização, foi possível identificar linhagens bastante promissoras, as quais associam alta produção de biomassa com baixo-médios valores de lignina, ou seja, caracteres desejáveis da biomassa para produção de etanol de segunda geração (ZHAO et al., 2009), como demonstrado na Figura 2. Além disso, alguns materiais apresentam alta biomassa e alto teor de lignina, podendo ser utilizados no futuro para cogeração de energia (bioeletricidade).

As análises fenotípicas realizadas sugerem que o painel de sorgo biomassa apresenta grande diversidade, o que é fundamental para sua utilização futura no programa de melhoramento e também para estudos genéticos.

Tabela 1. Resultado das análises de variância para florescimento (Flor), em dias; altura de plantas (Altura), em m; produção de massa verde (PMV), em t.ha⁻¹; produção de massa seca (PMS), em t.ha⁻¹; fibra em detergente ácido (FDA), em %; fibra em detergente neutro (FDN), em %; teor de celulose, em %; teor de hemicelulose, em %; e teor de lignina, em %, obtidos a partir da avaliação de linhagens de sorgo, avaliados em Sete Lagoas-MG, nas safras agrícolas de 2010/2011 e 2011/2012.

FV	GL	Flor	Altura	PMV ^a	PMS	FDA	FDN	Celulose	Hemicel	Lignina
Blocos/Anos	4	52,27	0,69	527,18	154,02	488,78	404,19	250,82	137,14	16,23
Genótipos	98	333,14 *	4,13 **	**	**	** 131,83 **	201,05 **	39,76 **	31,18 **	8,90 **
Anos	1	3220,02 *	10,86 *	1489,16 **	164,79	** 42,21 NS	1152,54 NS	3632,93 *	943,49 NS	65,54 NS
G x A	98	63,73 *	0,17 **	46449,22 **	9949,98	** 28,20 **	55,81 **	134,07 **	18,59 NS	2,22 **
Resíduo	392	29,52	0,08	293,62	43,21	18,69	29,72	13,03	15,04	1,09
Média		75,37	2,43	55,19	14,64	41,66	67,22	33,86	25,97	5,88
CV(%)		7,21	11,94	16,20	23,62	10,38	8,11	10,66	14,93	17,79

^acorreção de estande por covariância de estande ideal

*, ** Significativo, pelo teste F a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

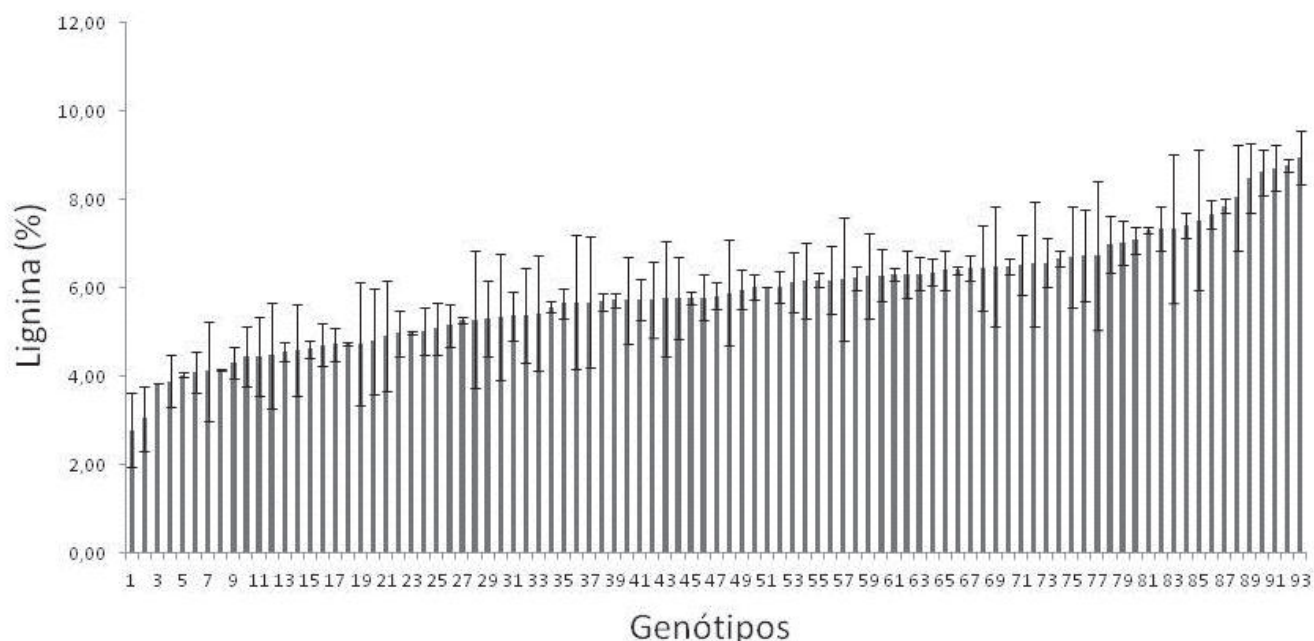


Figura 1. Dados médios de lignina (% em relação ao peso seco da amostra) para 100 genótipos avaliados durante os dois anos de safra agrícola.

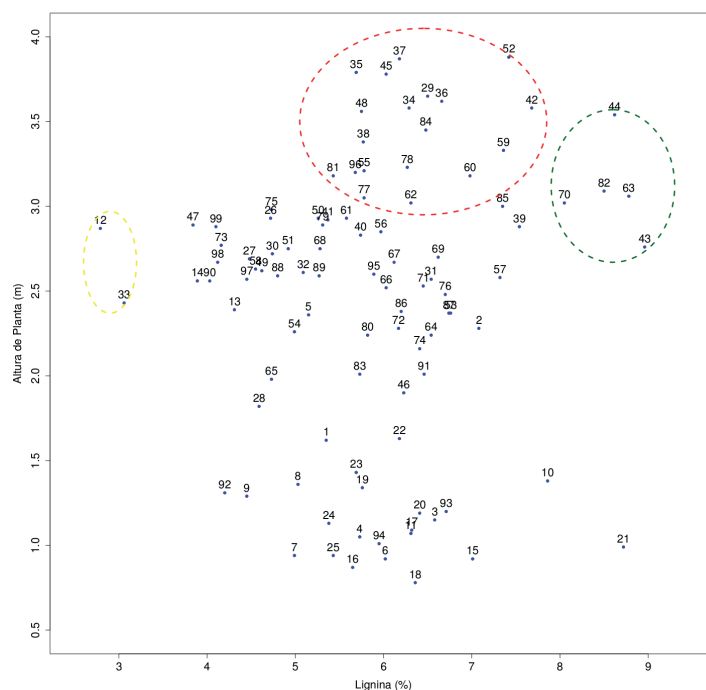


Figura 2. Dispersão dos dados fenotípicos altura de planta (m) e teor de lignina (%) para os 100 genótipos avaliados durante dois anos. Três grupos são identificados: em amarelo, dois genótipos apresentam baixo teor de lignina com altura de planta superior a 2,5 m, enquanto que no grupo vermelho vários genótipos de alta biomassa (altura de planta entre 3 e 4 m) apresentam valores médios de lignina. Ambos os grupos apresentam materiais com alto potencial para uso no desenvolvimento de híbridos de sorgo biomassa visando a produção de etanol de segunda geração. No grupo circulado em verde temos os genótipos de alta biomassa e maior teor de lignina, os quais seriam mais indicados para o desenvolvimento de híbridos visando a produção de bioeletricidade pela queima da biomassa.

Conclusão e Perspectivas Futuras

Verificou-se que esse painel apresenta grande variabilidade para rendimento de biomassa, além de variar para componentes bioquímicos, como lignina, celulose e hemicelulose. Assim, os dados fenotípicos obtidos, que apresentaram baixo CV e alta herdabilidade para as características avaliadas, demonstram o grande potencial desse painel para estudos futuros de mapeamento associativo, utilizando-se genotipagem em larga escala, a fim de se identificarem QTLs associados a características diretamente ligadas à biomassa, como altura de planta, peso de massa seca, teores de lignina e celulose. Uma vez identificados e validados os QTLs, a seleção assistida por marcadores moleculares poderá ser utilizada no futuro para introgressão de características que irão permitir a obtenção de variedades/híbridos de sorgo mais adequados à produção de bioenergia.

Além disso, os dados fenotípicos relacionados à qualidade da biomassa estão sendo utilizados na Embrapa Milho e Sorgo para desenvolvimento de curvas de calibração em equipamento de espectrometria de infravermelho próximo (NIRS), para a fenotipagem mais rápida e com menor custo dos materiais de sorgo utilizados no programa e em estudos genéticos.

Agradecimentos

Esse trabalho foi financiado e realizado como parte das atividades do projeto MP3 da Embrapa “Análise Molecular da Via Biossintética de Lignina em Sorgo Visando o Desenvolvimento de Biomassa de Qualidade para Produção de Etanol de Segunda Geração” (2010-2013) e do projeto FAPEMIG/PRONEX “Núcleo integrado de pesquisa, desenvolvimento e inovação de biocombustíveis, em Minas Gerais” (2010-2012). Os autores agradecem à Dra. Maria Marta Pastina (Embrapa Milho e Sorgo) pela assistência na elaboração dos gráficos.

Referências

- BARRIÈRE, Y.; RIBOULET, C.; MÉCHIN, V.; MALTESE, S.; PICHON, M.; CARDINAL, A. J.; LAPIERRE, C.; LÜBBERSTEDT, T.; MARTINANT, J. P. Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as a model system. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 1, n. 3, p. 133-156, 2007.
- DAMASCENO, C. M. B.; SOUSA, S. M. de; NODA, R. W.; PARRELLA, R. A. da C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHAES, J. V. de. **A importância da lignina para a produção de etanol de segunda geração**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 35 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 108).
- DAMASCENO, C. M. B.; PARRELLA, R. A. da C.; RODRIGUES, J. A. S.; SCHAFFERT, R. E. **Validação de marcadores moleculares para introgressão da característica nervura marrom (bmr6) em linhagens de sorgo biomassa utilizando retrocruzamento assistido**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 184).
- DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, New York, v. 27, p. 327-337, 2005.
- LOPEZ-CASADO, G.; URBANOWICZ, B. R.; DAMASCENO, C. M. B.; ROSE, J. K. C. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 1-9, 2008.
- PARRELLA, R. A. da C.; RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; DAMASCENO, C. M. B.; SCHAFFERT, R. E. **Desenvolvimento de híbridos de sorgo sensíveis ao fotoperíodo visando alta produtividade de biomassa**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

PARRELLA, R. A. da C.; SCHAFFERT, R. E.; MAY, A.; EMYGDIO, B.; PORTUGAL, A. F.; DAMASCENO, C. M. B. **Desempenho agrônomo de híbridos de sorgo biomassa**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 41).

SABALLOS, A.; EJETA, G.; SANCHEZ, E.; KANG, C.; VERMERRIS, W. A genomewide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] identifies SbCAD2 as the Brown midrib 6 gene. **Genetics**, Austin, v. 181, p. 783-795, 2009.

SOMERVILLE, C. The billion-ton biofuels vision. **Science**, Washington, v. 312, p. 1277, 2006.

SOMERVILLE, C. Biofuels. **Current Biology**, London, v. 17, p. R115-R119, 2007.

VAN DER WEIJDE, T.; ALVIM KAMEI, C. L.; TORRES, A. F.; VERMERRIS, W.; DOLSTRA, O.; VISSER, R. G.; TRINDADE, L. M. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013. Publicado online em 3 maio 2013.

VERMERRIS, W.; SABALLOS, A.; EJETA, G.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; CARPITA, N. C. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. S3, p. S142-S153, 2007.

ZHAO, R.; BAN, S. R.; WANG, D.; PARK, S. H.; SCHOBBER, T. J.; WILSON, J. D. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain. **Journal of Cereal Science**, London, v. 49, p. 230-238, 2009.

Circular Técnica, 190

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2013): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.